CITRONENSÄURE
ALS NORMALER BESTANDTEIL DER KUHMILCH.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE,

VORGELEGT

DER HOHEN PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT

DER

UNIVERSITÄT ERLANGEN

VON

THEODOR HENKEL

AUS

WOLFETSCHWENDEN.

(SONDERABDRUCK AUS DEN LANDWIRTSCHAFTL. VERSUCHS-STATIONEN, BD. XXXIX.)

MERSEBURG.
BUCHDRUCKEREI VON FRIEDRICH STOLLBERG.
1891.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535709_0043

Ausser Eiweissstoffen, Fett, Milchzucker und Aschenbestandteilen sind in der Milch noch geringe Mengen anderer Stoffe enthalten, welche man bei der Analyse oder bei Untersuchungen über die Eigenschaften der Milch in der Regel unberücksichtigt lässt.

An stickstoffhaltigen Körpern wurden neben Eiweissstoffen gefunden: Harnstoff, Hypoxanthin, Ammoniak, welche, weil im Blute und Gewebsflüssigkeiten enthalten, auch in die Milch gelangen können. Die ältere Angabe, dass Peptone in der Milch enthalten seien, ist nach neueren Untersuchungen unrichtig [1]. Lecithin ist als normaler Milchbestandteil mit Sicherheit erkannt. Von stickstofffreien Stoffen wurde nur Cholesterin als normaler Milchbestandteil nachgewiesen, während die von RITTHAUSEN[2]) gemachte Angabe, dass in der Milch auch ein dextrinartiger Körper enthalten sei, noch näherer Untersuchungen bedarf.

Unter den bisher nachgewiesenen Milchbestandteilen vermisst man aber organische Säuren, deren Anwesenheit in der Milch man aus dem Verhalten der Milchsalze mit grosser Wahrscheinlichkeit folgern kann.

SOXHLET[3]) hat zuerst darauf aufmerksam gemacht, dass die in der Milch gelöste Kalkmenge im Widerspruch zu stehen scheine mit dem Gehalt der Milch an gelöster Phosphorsäure, und die Vermutung ausgesprochen, dass eine organische Phosphorsäure, deren neutrales Kalksalz löslich ist, in der Milch enthalten sei. SÖLDNER hat dann weiter in seiner Arbeit über „die Salze der Milch"[4]) näher begründet, warum die Zusammen-

---

1) HAMMARSTEN, Jahrb. f. Tierchemie, 6.13. HOFMEISTER, Zeitschrift f. physiol. Chemie, 2, 288. DOGIEL, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 9, 591.

2) RITTHAUSEN, Journ. f. prakt. Chemie N. F. 15, 329.

3) Journ. f. prakt. Chemie, N. F. 6, 1.

4) Landw. Vers.-Stationen 35, 354.

setzung der in der Milch gelösten Salze zu der Annahme dränge, dass in der Milch organische Säuren enthalten sein müssen.

Milchsäure ist in der frischen Milch nicht vorhanden, wie schon Haidlen[1]) gezeigt hat; ihr Fehlen in frischer Milch ist übrigens schon daraus zu entnehmen, dass die in gestandener Milch gefundene Milchsäure erst durch einen Gärungsvorgang aus dem Milchzucker entstanden ist, die Milch aber, solange sie sich in der Drüse befindet, keimfrei ist, also frisch gemolken auch noch keine Zersetzungsprodukte enthalten kann.

Die einzige Angabe in der Litteratur über das Vorkommen einer organischen Säure in der Milch rührt von Duval[2]) her, welcher mitteilt, dass er in der frischen Pferdemilch das Salz einer Säure gefunden habe, welche in Gruppen von kleinen Nadeln krystallisiert, nicht flüchtig ist, beim Erhitzen einen eigentümlichen Geruch verbreitet und nach ihrem Verhalten zu salpetersaurem Silber und Eisenchlorid sich von der Hippursäure unterscheide. Duval nennt die Säure Acide equinique.

Meine Untersuchungen über den Gehalt der Milch an organischen Säuren führten zu einem Ergebnis, welches, wie Söldner in der schon genannten Arbeit näher darlegte[3]), eine fühlbare Lücke in unseren Kenntnissen über die Zusammensetzung der Milch ausfüllt.

Nach den früher citierten Erwägungen müssen die in der Milch vermuteten organischen Säuren sich als lösliche Salze im Milchserum befinden. Die Schwierigkeit, Milchserum ohne weitere chemische Eingriffe, also durch Thonzellen-Filtration zu gewinnen, nötigte mich zunächst, Serum zu verwenden, welches durch Abscheidung des Käsestoffs mittelst Labferment erhalten und auf folgende Weise von noch gelösten Eiweissstoffen befreit war. Frisch centrifugierte Magermilch wurde durch eine kräftige Labfermentlösung (auf 2 Liter Milch 0.1 ccm) innerhalb einer halben Stunde zur Gerinnung gebracht, der Käse abgepresst, die erhaltenen trüben Molken mit 10 ccm Normal-Essigsäure und mit 10 g fein aufgeschlemmter spanischer

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Phys. 45, 263.

[2]) Duval, Compt. rend. 82, 419.

[3]) Söldner bezieht sich auf eine vorläufige Mitteilung über meine Versuchsresultate, welche Herr Prof. Soxhlet der Münchener Morphol. Physiol. Gesellschaft machte; Bericht hierüber Münch. Med. Wochenschrift 1888 Nr. 19.

Klärerde pro Liter versetzt, aufgekocht, filtriert, mit Kalkmilch soweit neutralisiert, dass die Acidität normalen Milchserums erreicht wurde (100 ccm entsprechend 3.2 ccm Viertel-Norm.-Natron) und nochmals filtriert.

Die Anwendung der spanischen Klärerde, wie solche zum Klären von Wein etc. verwendet wird, ermöglicht fein suspendierte Eiweisskörper, welche sonst jeder Filtration widerstehen und die Filtrate opalisierend erscheinen lassen, aus der Lösung zu beseitigen. Auf diese Weise wurde ein vollkommen klares Milchserum von normaler Acidität erhalten, welches nur noch ausserdem etwas essigsauren Kalk enthielt.

Beim Eindampfen des Serums, was zunächst in der Absicht geschah, die Lösung behufs weiterer Verarbeitung zu konzentrieren, schied sich ein pulveriger Niederschlag aus, der abfiltriert mit heissem Wasser bis zum Verschwinden der Milchzucker-Reaktion ausgewaschen und mit Äther-Alkohol entwässert folgendes Verhalten zeigte:

Im Reagenzglase erhitzt: Abscheidung von Kohle und Auftreten von Aceton-Geruch; auf dem Platinblech erhitzt: Verglimmen unter Zurücklassen von schwer verbrennbarer Kohle; letztere auf dem Gebläse verascht giebt weisse Asche, die aus Ätzkalk besteht und nur Spuren von Phosphorsäure enthält. Die bei 100° getrockneten Niederschläge aus 6 verschiedenen Milchproben enthielten 32—36,4 % Calciumoxyd; 2 Proben waren frei von Phosphorsäure, die übrigen gaben, qualitativ geprüft, mehr oder minder schwache Phosphorsäure-Reaktion. Man hatte es also mit dem Kalksalz einer organischen Säure zu thun, welchem öfters eine geringe Menge Calciumphosphat beigemischt war.

Zur Abscheidung der organischen Säure wurde in verschiedener Weise verfahren:

A. Das Kalksalz wurde mit soviel einer Oxalsäurelösung gekocht, als zur Bindung des Kalkes erforderlich war; beim Eindampfen des Filtrats schied sich zunächst eine Kalkverbindung in perlmutterartig glänzenden Blättchen aus, welche abfiltriert, wie später gezeigt werden wird, aus einem sauren Kalksalz der organischen Säure bestand; das zum Sirup eingedampfte Filtrat krystallisierte nach einigen Tagen zu einem festen Kuchen.

B. Das Kalksalz wurde in verdünnter Salpetersäure gelöst, zur Lösung Bleiessig hinzugefügt, das ausgewaschene Bleisalz mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Lösung zum Sirup einge-

dampft. Aus dem Sirup krystallisierten nach 5 Tagen über Chlorcalcium büschelförmig angeordnete Nadeln von ziemlicher Grösse; die Krystalle wurden in Alkohol gelöst, eine geringe Menge flockiger Ausscheidung abfiltriert, zum Sirup neuerdings abgedampft und der Krystallisation überlassen.

Sowohl die nach A als nach B erhaltenen Krystalle wurden zur Anstellung qualitativer Reaktionen verwendet, zur Darstellung grösserer Mengen der reinen Säure aber folgendes Verfahren eingeschlagen, welches in einfacherer Weise grössere Ausbeuten und reinere Präparate gab:

C. 200 Liter frisch gemolkener Milch — in Portionen von je 100 Liter pro Tag — wurden in der früher angegebenen Weise von Eiweissstoffen befreit und das klare Serum auf einer flachen Nickelpfanne unter schwachem Sieden auf etwa $^1/_{10}$ eingedampft und so 350 g lufttrockenes Kalksalz gewonnen.

Das Salz wurde portionenweise mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt; 2 g des Salzes verbrauchten beim Titrieren mit Methyl-Orange 10.5 ccm Halb-Normal-Schwefelsäure, um allen Kalk an Schwefelsäure zu binden und einen minimalen Überschuss an freier Schwefelsäure in der Lösung zu erhalten; oder von mit 1 Volum Wasser verdünnter Schwefelsäure waren 28 ccm erforderlich, um 100 g Salz zu zersetzen. Das so zersetzte Gemisch wurde mit wasserfreiem Gips, welcher vorher mit Äther extrahiert worden war, zur Bindung des Wassers verrührt, das Gemenge in der Luftleere über Schwefelsäure 1—2 Tage getrocknet und die sehr fein zerriebene Substanz in einem grösseren Heberextraktions-Apparate mit Äther extrahiert. Nach mehrstündigem Extrahieren schieden sich im Ätherkolben schwach gelbliche Krystallkrusten aus, welche in Wasser gelöst, mit Gips neuerlich eingetrocknet und nochmals mit Äther extrahiert, vollkommen weisse Krystallkrusten ergaben. Die Krystalle waren wasserfrei. Auf diese Weise wurden ca. 100 g der reinen Substanz dargestellt, welche zur Feststellung der Natur der Säure dienten.

Elementar-Zusammensetzung. Von der Substanz, welche 4 Tage über Schwefelsäure in der Luftleere gestanden, wurden ca. 0.3 g mit Kupferoxyd im Sauerstoffstrome verbrannt:

	C %	H %	O %
	37.74	4.51	57.74
	37.67	4.47	57.89
Mittel	37.70	4.47	57.81
Wasserfreie Citronensäure $C_6H_8O_7$ theoretisch:			
	37.50	4.16	58.34

Schmelzpunkt. In der Kapillarröhre im Schwefelsäurebade erhitzt, sinterte die Substanz bei 146° und kam zum Schmelzen bei 149° C.; käufliche reine Citronensäure, getrocknet in der gleichen Weise untersucht, schmolz bei 150° C.

Basicität. Die Citronensäure ergiebt beim Titrieren mit Natronlauge unter Anwendung von Phenolphtaleïn als Indikator Farbenumschlag, wenn auf ein Molekül der Säure 3 Molekül Natrium und soviel freies Alkali vorhanden sind, als zur Veränderung des Indikatorfarbstoffs erforderlich ist.[1])

0.6078 g der wasserfreien organischen Säure verbrauchten 38.6 ccm Viertel-Normal-Natronlauge; auf 1 Molekül Natrium treffen somit 63.09 g der Säure, oder um das gesättigte Salz zu bilden, auf 3 Molekül Natrium 189.27 g; theoretisch 192 g: Molekulargewicht der Citronensäure.

Die Übereinstimmung zwischen der gefundenen und der theoretisch berechneten Zahl ist eine so gute, als durch den Titrierungsversuch überhaupt zu erzielen.

Zusammensetzung der Kalksalze. Gut charakterisiert sind das Tricalcium- und das Dicalcium-Citrat.

Tricalcium-Citrat $(C_6H_5O_7)_2 Ca_3, 4 H_2O$; eine Portion der Säure mit soviel Natronlauge versetzt, dass nach dem Titrationsversuch bei Gegenwart von Phenolphtaleïn Rotfärbung der Lösung hervorgerufen worden wäre, die Lösung kochend mit Chlorcalcium gefällt, der ausgewaschene Niederschlag über Schwefelsäure getrocknet. In gleicher Weise wurde das entsprechende Kalksalz aus käuflicher Citronensäure dargestellt und untersucht.

	Kalksalz aus der Milch;	aus käufl. Citrs.;	Tricalciumcitr.
Wasser entweichend bei 100°. . . .	9.80	9.82	9.47 %[2])
Calciumoxyd . . . in der bei 100° getrockneten Subst.	29.47	29.44	29.47 %
	32.54	32.64	32.55 %

Dicalcium-Citrat; $Ca C_6H_6O_7 H_2O$. Das Salz krystallisiert leicht in glänzenden Schuppen. Untersucht wurde das Salz, welches sich bei der Darstellung A gelegentlich beim Eindampfen des Serums, wohl wegen zufällig etwas grösserer Acidität des letzteren, ausschied. Dieses Präparat enthielt nach dem Trocknen bei 100° Calciumoxyd 24.51 %; theoretisch

---

[1]) Thomsen, Referat Fresenius Zeitschr. f. anal. Chem. 27, 59.

[2]) Entsprechend 3 Mol.; das 4. Mol. entweicht erst bei 200°. (Held, Gmelin, Handbuch 5, 838.)

verlangt: 24.35 %. — Löslichkeitsverhältnisse: Die Säure ist, wie die Citronensäure, sehr leicht löslich in Wasser, Äthyl- und Methyl-Alkohol, schwer löslich in Äther, unlöslich in Benzol.

Qualitative Reaktionen. Die Säure zeigt die charakteristische SABANIN-LASKOWSKI'sche Reaktion [1]), welche nach diesen Autoren nur der Citronensäure und Akonitsäure eigentümlich ist, genau in derselben Weise, wie käufliche Citronensäure, nämlich Blaufärbung der vorher mit Ammoniak im zugeschmolzenen Rohre erhitzten Lösung beim Stehen an der Luft.

Die Identität der von mir in der Kuhmilch gefundenen organischen Säure mit Citronensäure ergiebt sich sonach, kurz wiederholt, aus der Übereinstimmung in Bezug auf:

1. Elementarzusammensetzung. 2. Fähigkeit, ein Phenolphtalein nicht rötendes, gesättigstes Natronsalz (Trinatriumcitrat) zu bilden. 3. Krystallwassergehalt der gesättigten Kalkverbindung und Verhalten des Krystallwassers beim Trocknen des Salzes über Schwefelsäure in der Luftleere und bei 100° C. 4. Kalkgehalt der gesättigten Kalkverbindung (Tricalciumcitrat). 5. Kalkgehalt des ungesättigten Kalksalzes (Dicalciumcitrat). 6. Schmelzpunkt. 7. Löslichkeit in den gewöhnlichen Lösungsmitteln und 8. Verhalten zu der SABANIN - LASKOWSKI'schen Reaktion, welche nur der Citronensäure und der Akonitsäure eigentümlich ist.

Das Vorkommen der Citronensäure in der Kuhmilch ist im Hinblick darauf, dass diese Säure bisher nur im Pflanzen-, nie aber noch im tierischen Körper oder in Sekreten desselben gefunden wurde, und dass, wie mehrfach festgestellt, die in der Nahrung enthaltene Citronensäure im Blute rasch verbrannt wird, eine so eigentümliche Thatsache, dass obige ausführliche Identitätsbeweisführung nicht genügt, um die Citronensäure als normalen Bestandteil der Kuhmilch zu charakterisieren. Es ist vielmehr noch die Frage zu erörtern, ob die Citronensäure überhaupt ursprünglich in der Milch enthalten ist, oder ob sie nicht etwa erst durch die angewandten Operationen aus anderen Milchbestandteilen gebildet wurde. Eine solche Möglichkeit ist nicht von der Hand zu weisen, wenn man berücksichtigt:

1. dass die Gerinnung des Kaseïn durch Lab nicht in einem einfachen Unlöslichwerden, sondern in einer tiefer gehenden

---

[1]) FRESENIUS, Zeitschr. f. anal. Chem. 17, 73.

chemischen Umwandlung dieses Eiweisskörpers besteht, bei welcher auch einfacher zusammengesetzte Spaltungsprodukte auftreten können; 2. dass bei längerem Erhitzen des Serums Zersetzungsprodukte des sich hierbei ja leicht bräunenden Milchzuckers auftreten können, wozu die Anwesenheit des hinzugekommenen essigsauren Kalks auch einiges beitragen kann.

Zur Beseitigung des ersten Einwandes — Wirkung des Labfermentes — wurden folgende Versuche ausgeführt:

1. 10 Liter frischer Milch wurden durch Zusatz von 400 ccm Normal-Salzsäure in der Siedehitze koaguliert, 100 g spanische Erde hinzugefügt, filtriert, das Filtrat durch Zusatz von titrierter Natronlauge auf die Acidität des normalen Milchserums gebracht, d. i. 3.2 ccm $^1/_4$ Normal-Natron auf 100 ccm M. von dem entstandenen Kalkphosphat abfiltriert und 6 Liter so erhaltenen klaren und eiweissfreien Serums auf $^1/_{10}$ Volum eingedampft. Es schied sich ebenso wie beim Labserum das Kalksalz ab, dessen Menge lufttrocken 10 g betrug — pro Liter 1.66 g — und nach Zersetzung mit Schwefelsäure, Auftrocknen mit Gips in bekannter Weise, als Ätherextrakt: Citronensäure lieferte.

2. Frische Kuhmilch wurde durch 6 grosse Thonzellen filtriert; 1 Liter des erhaltenen Serums wurde aufgekocht, ausgeschiedenes Eiweiss und Kalkphosphat abfiltriert und das Filtrat auf $^1/_{10}$ Volum abgedampft; 1.8 g ausgeschiedenen Kalksalzes lieferten nach der Zersetzung mit Schwefelsäure etc. als Ätherextrakt: Citronensäure. Aus einem nicht mit Labferment hergestellten Milchserum scheidet sich beim Eindampfen bei Siedetemperatur Calciumcitrat in annähernd gleicher Menge aus, wie bei Labserum. Die Citronensäure des Labserums ist also nicht ein Produkt der Labwirkung.

3. Es wurden a) 3 Liter Labserum, b) 3 Liter Serum erhalten durch Ausfällen mit Salzsäure und einmaligem Aufkochen, Neutralisieren etc., wie kurz vorher angegeben, c) $^1/_2$ Liter Thonzellenfiltrat in der Luftleere unter lebhaftem Sieden bei 40^0 rasch eingedampft, und in allen Fällen die normale Menge Calciumcitrat erhalten: — Beweis dafür, dass die gefundene Citronensäure nicht ein Produkt der Einwirkung längeren Erhitzens auf den Milchzucker oder einen andern Körper der Milch ist — resp. dass man die Citronensäure als einen Bestandteil der Milch selbst zu betrachten hat.

Für den Nachweis, dass die Citronensäure ein normaler Bestandteil der Kuhmilch ist, habe ich schliesslich 30 Proben Milch

aus verschiedenen Stallungen aus der Nähe von München, herrührend von verschiedenartig gefütterten Kühen — Heu allein, Heu mit Kleien, Branntweinschlempe, Biertreber, Rüben etc. — sowie die Mischmilch von Molkereien, welche mehrere Tausend Liter vieler Lieferanten verarbeiten, auf einen Gehalt an Citronensäure untersucht.

Zu diesem Behufe wurde das mit Lab, Essigsäure und spanischer Erde dargestellte Serum — in einigen Fällen mit verdünnter Kalkmilch, später immer mit Natronlauge — auf die Acidität des normalen Milchserums (Thonzellenfiltrat) gebracht, von ausgeschiedenem Kalkphosphat abfiltriert und 1 Lit. solchen Serums auf $^{1}/_{10}$ Vol. auf dem Wasserbade eingedampft. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde mit heissem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, auf gewogenem Filter bei 100° getrocknet und gewogen. Der Niederschlag war frei von Phosphorsäure oder enthielt nur minimale Mengen Kalkphosphat. Die Menge des Kalksalzes betrug 1.5—2.1 g, entsprechend 1.0—1.4 g Citronensäure (berechnet aus Tricalciumcitrat mit 32.55 $^{0}/_{0}$ Calciumoxyd).

Einen weiteren Beitrag zu dieser Feststellung lieferte die von mir gemachte Beobachtung, dass sich in der kondensierten sterilisierten Milch regelmässig eine Ausscheidung findet, welche fast nur aus citronensaurem Kalk besteht. In der seit 5 Jahren meiner Leitung unterstellten Milchprodukten-Fabrik [1]) wird die frisch gemolkene Milch, nachdem dieselbe durch Centrifugieren gereinigt wurde, im Vacuum auf $^{1}/_{3}$ eingedampft und die so eingedickte Milch in verlöteten Blechbüchsen durch Erhitzen sterilisiert. In dieser Milchkonserve finden sich nach mehrtägigem Lagern Konkretionen oder voluminöse Niederschläge, welche sich beim Verdünnen zu Boden setzen. Solche Ausscheidungen, a) Konkretion aus einer Büchse, b) Absatz der verdünnten Konserve aus mehreren Büchsen verschiedener Darstellung mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen, enthielten lufttrocken:

	A	B
Asche	50.3	—
Organische Substanz	49.7	—
Wasser	7.81	—
Stickstoff	0.70	1.12
Stickstoff ber. auf Kaseïn	4.47	7.0
Phosphorsäure	Spuren	0.66
Calciumtriphosphat	„	1.44

[1]) Schüttendobel bei Harbatshofen, bayr. Algäu.

Im Ätherextrakt der mit Schwefelsäure zersetzten und mit Gips eingetrockneten Substanz fand sich wasserfrei krystallisierte Citronensäure, in gleicher Weise, wie bei der Extraktion des aus dem Milchserum ausgeschiedenen Kalksalzes. Die Konkretionen enthalten also geringe Mengen Kaseïn event. Calciumphosphat eingeschlossen und bestehen der Hauptmasse nach aus citronensaurem Kalk. Ist die genannte Ausscheidung nicht in Form von Konkretionen in der Konserve selbst zu finden, was der seltenere Fall ist, so findet man dieselbe ausnahmslos als voluminösen Absatz in der mit Wasser auf den ursprünglichen Wassergehalt verdünnten und einige Zeit gestandenen Flüssigkeit. Mehrere Tausend Büchsen dieser Milchkonserve, welche ich im Laufe der Jahre im Fabriksbetriebe zu prüfen hatte, zeigten ausnahmslos diese Ausscheidung und in ziemlich gleicher Menge, etwa 2.0—2.5 g pro Liter ursprünglicher Milch.

Aber auch in kondensierter Milch, welche nicht durch Sterilisieren, sondern durch Zusatz grosser Mengen Rohrzucker konserviert wird, findet sich diese Ausscheidung von citronensaurem Kalk, wenngleich viel feiner verteilt und, wie es scheint, auch in geringerer Menge.

Das Resultat der mitgeteilten Untersuchungen zahlreicher Milchproben, welche unter verschiedenen Produktionsbedingungen gewonnen wurden, sowie die umfangreichen Beobachtungen über die Ausscheidung des citronensauren Kalks in Milchkonserven, lassen es als sicher gestellt betrachten, dass die in der Milch gefundene Citronensäure nicht ein zufälliger, nur ab und zu vorkommender, sondern ein regelmässig vorhandener und normaler Bestandteil der Kuhmilch ist.

Vorliegende Arbeit wurde im Laboratorium der landwirtschaftlichen Central-Versuchs-Station in München und unter der Leitung des Herrn Professor Soxhlet ausgeführt.